

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 787 793

②1 N° d'enregistrement national : 98 16459

⑤1 Int Cl⁷ : C 07 K 5/087, A 61 K 38/06, A 61 P 35/00

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 24.12.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 30.06.00 Bulletin 00/26.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablis-
sement public à caractère scientifique et technologique
— FR.

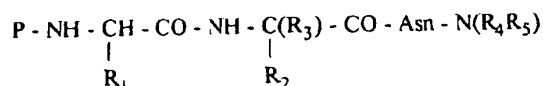
⑦2 Inventeur(s) : GARBAY CHRISTIANE, LIU WANG
QING, VIDAL MICHEL et ROQUES BERNARD
PIERRE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 COMPOSES PSEUDOPEPTIDIQUES DOTES D'UNE ACTIVITE INHIBITRICE A L'EGARD DES VOIES
ACTIVEES PAR LES PROTEINES A ACTIVITE TYROSINE KINASE ET LES COMPOSITIONS
PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT.

⑤7 L'invention a pour objet un composé répondant à la
formule générale I



dans laquelle:

- R₂ représente:
 - un radical phénylméthyle ou naphthylméthyle ou cyclohexylméthyle, 2- et 3-pyridinylméthyle, substitué sur le cycle en position para par un groupement acide ou
 - un radical alkyle de type (CH₂)_n (avec n = 3 ou 4) substitué en position terminale par un groupement acide.
- R₃ représente un groupement hydrogène ou alkyle en C₁ à C₄, linéaire ou ramifié ou alkylcycloalkyle avec un cycloalkyle en C₃ à C₆.

Elle a également pour objet l'utilisation d'un composé de formule générale I pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies liées à des processus prolifératifs, des cancers et/ou métastases.

FR 2 787 793 - A1



La présente invention a pour objet de nouveaux composés pseudopeptidiques dotés d'une activité inhibitrice à l'égard des voies activées par les protéines à activité tyrosine kinase et les compositions pharmaceutiques les contenant.

5

La prospection pour de nouveaux agents thérapeutiques contre les cancers et/ou les maladies associées à des désordres prolifératifs constitue actuellement un des pôles de recherche les plus importants de l'industrie pharmaceutique. Une nouvelle approche retenue pour identifier de nouveaux
10 composés, vise à inhiber les récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine kinase qui interviennent dans le processus de la transmission du signal.

On sait que la signalisation cellulaire, transmise par des facteurs externes, de type facteurs de croissance, hormones et neurotransmetteurs, à
15 des récepteurs transmembranaires, notamment à activité tyrosine kinase, TK est relayée par des signaux de reconnaissance impliquant des transmetteurs cytoplasmiques comme les protéines, nucléotides et ions, avant d'atteindre le noyau et d'activer des facteurs de transcription. Parmi ces transmetteurs cytoplasmiques, les protéines à activité tyrosine kinase, réceptrices ou non,
20 jouent un rôle essentiel en phosphorylant des protéines cellulaires sur des résidus tyrosine et en activant des cascades de protéines kinases conduisant à la division et/ou à la différenciation cellulaire.

Les protéines tyrosine kinases transmettent leur message par des successions d'interactions impliquant par exemple des résidus tyrosine de leur
25 extrémité C-terminale, capables, avec quelques aminoacides qui les encadrent, de reconnaître leurs cibles. Deux types de reconnaissance ont été rapportés selon que la région phosphotyrosine reconnue implique les aminoacides qui précèdent ou succèdent le résidu phosphotyrosine (pTyr). Ce sont respectivement les domaines PTB (phosphotyrosine binding domain) et les
30 domaines SH2 (Src homology²). De nombreuses protéines contiennent des domaines PTB et/ou SH2 et sont impliquées dans la signalisation cellulaire et la transformation néoplasique. La protéine Grb2 (Growth factor receptor binding protein.) est l'une d'entre elles.

La protéine adaptatrice Grb2 joue un rôle direct dans la transmission du signal mitogénique entre les récepteurs à activité tyrosine kinase et la voie de signalisation de Ras. Grb2 est complexée par ses
5 domaines SH3 avec Sos (Son of Sevenless), le facteur d'échange nucléotidique de Ras et par son domaine SH2 avec les récepteurs à activité TK, directement ou par l'intermédiaire d'autres adaptateurs comme Shc (SH2 domain containing adaptor protein). Lorsqu'il y a activation du récepteur, Grb2/Sos est recruté à la membrane et alors capable d'activer Ras (Revue dans Chardin et al. FEBS
10 Letters, 1995, 369, 47-51).

L'importance de Grb2 dans la régulation de la voie de signalisation Ras-dépendante a été démontrée dans le cas des tumeurs surexprimant le récepteur à l'EGF (Epidermal growth factor) (tumeurs du sein - Sastry et al., Int. J. Cancer. 1997, 70, 208-213) ou son analogue oncogénique HER2 (tumeurs
15 de la vessie ; Janes et al., Oncogène, 1994, 9, 3601) ou l'oncogène Bcr/Abl (leucémies myéloïdes lymphoblastiques. J. Exp. Med., 1994, 179, 167-175). En accord, une amplification du gène de Grb2 a été montrée dans certains cancers du sein (Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91, 2156-2160) et une surexpression de la protéine dans certaines lignées tumorales (MCF7, MCA-MB361, Oncogene,
20 1994, 9, 2723).

Contrairement à la plupart des domaines SH2 dont la spécificité est fonction de la nature de l'acide aminé en position +3 par rapport à la phosphotyrosine, la spécificité de reconnaissance du domaine SH2 de Grb2 avec les protéines tyrosine kinases est imposée par l'acide aminé en position
25 +2, pour lequel un résidu asparagine Asn est particulièrement favorable (Cussac et al. EMBO J. 1994, 13, 4011-21). De plus le peptide adopté, pour des raisons stériques une conformation (β -turn) impliquant le CO de pTyr et le NH de l'acide aminé +3 et possède deux sites d'ancrage au niveau des acides phosphotyrosine et asparagine (Rahuel et al., Nature Struct. Biol., 1996,
30 3, 586-589).

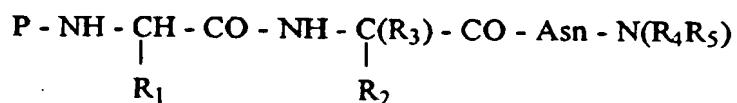
En conséquence, au regard de l'ensemble de ces informations, de nombreux efforts ont été réalisés pour tenter de s'opposer à l'interaction entre

les récepteurs activés contenant le résidu phosphotyrosine (pTyr) et la protéine Grb2 au niveau du domaine SH2 de celle-ci. Ainsi, des molécules capables de se lier au domaine SH2 de Grb2, ont été obtenues en utilisant des bibliothèques chimiques (Müllere et al., J. Mol. Biol., 1996, 28, 16500-16505), ou de phages
 5 (Gram, Eur. J. Biochem., 1997, 246, 633-637), ou par modification des peptides originaux, en se basant sur les données structurales des complexes évoqués ci-dessus.

Par ailleurs, des molécules pseudopeptidiques ayant de fortes affinités pour les domaines SH2, ont été obtenues, en particulier avec les
 10 protéines Src (Pacofsky et al., J. Med. Chem., 1998, 41, 1894-1908).

Dans le cadre de la présente invention, il est proposé une famille de composés possédant une très forte affinité pour Grb2 grâce en particulier à l'introduction d'un résidu aromatique chargé négativement et d'un blocage de la
 15 conformation de ces molécules par encombrement du carbone α d'un des résidus impliqués dans l'interaction.

Plus précisément, les composés proposés dans le cadre de la présente invention répondent à la formule générale I



20

dans laquelle :

- P représente un groupement protecteur ou un atome d'hydrogène,
- R_1 représente
 - 25 - un radical phénylméthyle avec le noyau phényle étant substitué en position para par un radical phosphate, phosphonométhyle, phosphonomonofluorométhyle ou phosphonodifluorométhyle ou
 - un radical naphthylméthyle pouvant être substitué en position
 4 par un radical phosphate, phosphonométhyle, phosphonomono- ou
 30 phosphonodifluorométhyle,

chacun de ces radicaux étant en outre le cas échéant substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi les groupements alcoyle en C₁ à C₄, alcoxy en C₁ à C₄, et/ou un ou plusieurs atomes d'halogène,

— R₂ représente :

- 5 - un radical phénylméthyle ou naphtylméthyle ou cyclohexylméthyle, 2- ou 3-pyridinylméthyle, substitué sur le cycle en position para par un groupement phosphate, phosphonoalkyle en C₁ à C₂, et de préférence phosphonométhyle, phosphonomonofluorométhyle, phosphonodifluorométhyle, phosphonate, phosphinate, sulfonate, sulfonométhyle, carboxylate, carboxyméthyle, carboxyméthoxy, malonyl, 2-
10 (dicarboxy)éthyle, 2-malonyloxy, 5-tétrazolyle ou 5-tétrazolylméthyle ou
- un radical alkyle de type (CH₂)_n (avec n = 3 ou 4) substitué en position terminale par un groupement phosphate, phosphonoalkyle en C₁ à C₂ et de préférence phosphonométhyle, phosphonomonofluorométhyle et
15 phosphonodifluorométhyle, phosphonate, phosphinate, sulfonate, sulfonométhyle, carboxylate, carboxyméthyle, carboxyméthoxy, malonyl, 2-malonyloxy, 2-dicarboxyéthyle, 5-tétrazolyle ou 5-tétrazolylméthyle.

— R₃ représente un groupement alkyle en C₁ à C₄, linéaire ou ramifié, ou alkylcycloalkyle avec un cycloalkyle en C₃ à C₆.

20 - R₄ et/ou R₅ représentent

- un hydrogène,
- un groupement alkyle en C₁ à C₆, linéaire ou ramifié
- un groupement arylalkyle en C₁ à C₆ avec aryl désignant un noyau phényle ou naphtyle le cas échéant substitué par un ou plusieurs
25 groupements hydroxyle, ou
- un enchaînement de type aminohexanoïque suivi par les séquences RQIKIWFQNRMRKWK (SEQ ID N° 1), IRQPKIWFNRRKPWK (SEQ ID N° 2), Cys-S-S-Cys-RQIKIWFQNRMRKWK (SEQ ID N° 3) et Cys-S-S-Cys-IRQPKIWFNRRKPWK dérivés d'antennapedia (SEQ ID N° 4) et leurs
30 sels pharmaceutiquement acceptables.

Au sens de la présente invention, on entend désigner sous la dénomination sels, l'ensemble des sels d'addition acides, et/ou de bases

susceptibles d'être obtenus à partir des composés revendiqués et qui s'avèrent pharmaceutiquement acceptables.

Il peut s'agir de sels de métaux alcalins, ou alcalinoterreux, de sels d'ammonium, de sels d'amines organiques. En ce qui concerne les sels d'additions acides, ils peuvent dériver d'acides hydrohalogénés ou d'autres acides organiques.

Comme groupement protecteur P convenant à l'invention, on peut notamment citer les groupements aminoalcoylcarbonyle (linéaire ou ramifié), aminoalcoxycarbonyle (linéaire ou ramifié), arylalcoylcarbonyle (linéaire ou ramifié) et arylalcoxycarbonyle (linéaire ou ramifié).

De manière inattendue, les inventeurs ont noté que la présence d'un cycle, de préférence aromatique, portant en position para, un substituant acide, de préférence de nature phosphorylée dans les composés de formule générale I, à titre de R_2 , était avantageuse en terme d'affinité pour le domaine SH2 de la protéine Grb2. Il se trouve que cet effet est renforcé par la présence d'un substituant encombrant sur le carbone α , représenté par R_3 .

Par ailleurs, la présence d'un groupement dérivé de groupes phosphonoalkyle, à titre de substituant au niveau de R_1 et/ou R_2 , est particulièrement intéressante dans la mesure où ce type de groupement n'est pas sujet à la dégradation par les phosphatases.

Quant à la présence d'un dérivé d'Antennapédia à titre de substituant R_4 et/ou R_5 elle est avantageuse pour promouvoir la pénétration cellulaire dudit composé.

Selon un mode privilégié de l'invention, les composés revendiqués répondent à la formule générale I dans laquelle :

- P représente un groupement RCO ou ROCO avec R représentant un aminoalcoyle en C_{1-4} ou aminophénylcoyle en C_{1-4} ,
- R_1 représente un groupement phénylméthyle substitué en position para par un substituant choisi parmi OPO_3H_2 , $CH_2PO_3H_2$, $CHFPO_3H_2$ et $CF_2PO_3H_2$,
- R_2 représente un groupement phénylméthyle substitué en position para par un substituant tel que défini ci-dessus en formule générale I,

- R_3 représente un groupement alcoyle en C_1 à C_3 ,
- R_4 et/ou R_5 représentent un atome d'hydrogène, un groupement alcoyle $(CH_2)_n-CH_3$ ou $(CH_2)_n-Ar$ avec Ar représentant un phényle ou α,β naphtyle substitué ou non et n compris entre 0 et 5 et leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

Dans une variante préférée de l'invention,

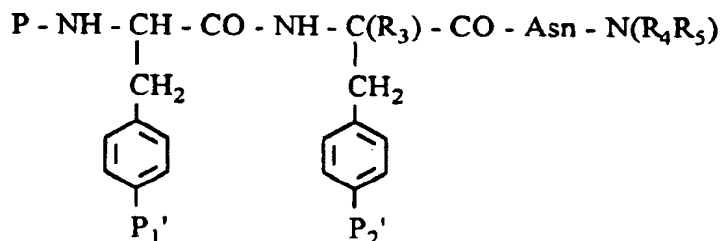
- R_1 représente un groupement phénylméthyle portant en position para un groupement phosphate,
- R_2 représente un groupement phénylméthyle portant en position para un groupement choisi parmi un phosphate, phosphonométhyle, un groupement 2-malonyloxy ou $(CH_2)_nCO_2H$ avec n égal à 0 ou 1,
- R_3 représente un groupement méthyle et
- R_4 et R_5 représentent tous deux un atome d'hydrogène et leurs sels.

A titre représentatif des composés pseudopeptidiques revendiqués on peut tout particulièrement citer les composés suivants :

- mAZ-pTyr-(α Me)pTyr-Asn-NH₂
- mAZ-pTyr-(α Me)pTyr-Asn-NH₂-Aha-Antennapedia
- mAZ-Pmp-(α Me)pTyr-Asn-NH₂
- mAZ-pTyr-(α Me)Phe(COOH)-Asn-NH₂
- mAZ-pTyr-(α Me)Phe(CH₂-COOH)-Asn-NH₂

La présente invention a également pour objet les composés pseudopeptidiques de formule générale II à titre de prodrogues des composés de formule générale I.

En effet, les dérivés phosphates, phosphonates, phosphinates et carboxylates tels que revendiqués ci-dessous peuvent être envisagés sous forme de prodrogues selon la formule générale II :



II

- 5 Dans laquelle P, R₃, R₄ et R₅ ont la même définition que dans la formule générale I, et les groupements phénylméthyles substitués par P₁' et P₂' sont les précurseurs des groupements R₁ et R₂.

Plus précisément,

- les groupements P₁' et/ou P₂', précurseur(s) du groupe
10 phosphate en R₁ et/ou R₂ peuvent être un groupement bis-(S-acyl-2-thioéthyl)phosphate ou bis-(acyloxyméthyl)phosphate,

– les groupements P₁' et/ou P₂', précurseur(s) du groupe phosphonométhyle en R₁ et/ou R₂ peuvent être un groupement bis-(S-acyl-2-thioéthyl)phosphonométhyle ou bis-(acyloxyméthyl)phosphonométhyle,

- 15 – le groupement P₂', précurseur du groupe phosphonate en R₂ peut être un groupement bis-(S-acyl-2-thioéthyl)phosphonate ou bis-(acyloxyméthyl)phosphonate,

avec le terme acyle désignant dans ces définitions un groupement tertbutylcarbonyle ou isopropylcarbonyle ou acétyle,

- 20 – le groupement P₂', précurseur des groupes acide carboxylique, carboxyméthyle, carboxyméthoxy, malonyl, 2-malonyloxy, 2-(dicarboxy)éthyle en R₂, peut être un analogue estérifié sur la ou les fonctions acides carboxyliques des groupes R₂ identifiés ci-dessus sous forme d'un carboxylate de :

- 25 – arylalcoyle avec le terme aryl désignant un noyau benzénique et le terme alcoyle une chaîne carbonée linéaire ou ramifiée avec de 1 à 3 atomes de carbone ;

- morpholinylalcoyle $-(CH_2)_n(NC_4H_8O)$;
- pipéridinylalcoyle $-(CH_2)_n(NC_5H_{10})$ substitué éventuellement par un groupement OH, CO_2H , CO_2R' avec R' étant une chaîne alcoyle linéaire ou ramifiée contenant ou un reste benzyle ;
- 5 - pipérazinylalcoyle $-(CH_2)_n(NC_4H_8NH)$ substitué éventuellement par $(-N-C_4H_8-NR'')$ avec R'' représentant une chaîne alcoyle contenant de 1 à 6 atomes de carbone, un groupement benzyle ou un groupement phényle, avec n compris entre 1 et 3.

En ce qui concerne la préparation des composés revendiqués
10 dans le cadre de la présente invention, elle peut être réalisée selon des procédés connus.

Généralement, on procède à une condensation des différents motifs pseudopeptidiques en faisant réagir un groupement réactif d'un premier motif pseudopeptidique comme par exemple une fonction carboxyle avec un
15 groupement réactif complémentaire par exemple une fonction amine portée par un second motif pseudopeptidique.

En conséquence, la synthèse des composés revendiqués relèvent des compétences de l'homme du métier.

Les nouveaux composés ont pour caractéristique de posséder une
20 structure peptidomimétique, possédant en position 1, un résidu phosphotyrosine ou un substitut porteur d'une ou deux charges négatives et une protection éventuellement chargée positivement de l'azote N-terminal et possédant en position 2, un résidu stériquement encombré, de type alpha-phosphotyrosine ou un substitut de type phénylalanine ou
25 cyclohexylméthylalanine portant sur le noyau en position para, un substituant fortement électroattracteur telle une fonction acide ou un groupement phosphonate $CH_2PO_3H_2$, phosphate PO_3H_2 , tétrazolyle $c(CN_4H)$, et d'être également stériquement encombré sur le carbone alpha.

En raison de cette organisation pseudopeptidique, les composés
30 de formules générales I et II revendiqués sont capables d'inhiber efficacement les interactions entre des protéines comprenant un domaine de liaison SH2, comme Grb2, et des protéines phosphorylées de type récepteur des facteurs de

croissance à activité tyrosine kinase comme le récepteur à l'EGF. Les composés de formules générales I et II bloquent la capacité des protéines tyrosines kinases à initier la cascade de signalisation passant par les protéines à domaine SH2. Il en découle une inhibition des voies de transmission du signal
5 impliqué dans les maladies tumorales.

Les résultats présentés en exemples ci-après rendent compte de l'affinité manifestée par des composés de formule générale I à l'égard du domaine SH₂ de la protéine Grb2 et donc de leur capacité à intervenir au niveau de son interaction avec les récepteurs à activité tyrosine kinase.

10 En conséquence, les composés de formule générale I et formule générale II sont particulièrement intéressants pour traiter les maladies qui répondent à une inhibition de l'interaction des protéines possédant des domaines SH2 avec des phosphoprotéines dont plus particulièrement les protéines tyrosine phosphorylés.

15 Les applications cliniques auxquelles sont plus particulièrement destinés les composés selon l'invention sont le traitement des cancers, des métastases et/ou maladies liées à des processus prolifératifs.

A titre illustratif des maladies liées aux processus prolifératifs, on peut plus particulièrement citer les pathologies liées aux mécanismes
20 d'angiogénèse, l'arthrite rhumatoïde, les désordres inflammatoires et les troubles liés à l'épaississement des vaisseaux lors de la resténose.

A ces fins, les composés revendiqués et leurs dérivés peuvent être utilisés pour la préparation de compositions pharmaceutiques correspondantes.

25 Plus particulièrement, la présente invention concerne donc, selon un autre de ses aspects, une composition pharmaceutique comprenant en tant que principe actif au moins un composé de formule générale (I) ou un composé de formule générale II.

Bien entendu, ce composé peut y être associé à au moins un
30 véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De même on peut envisager d'introduire conjointement deux ou plusieurs composés de formule générale I et/ou II dans une même composition pharmaceutique.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par voie orale, parentérale ou transdermique.

En ce qui concerne l'administration par voie orale, on utilise en particulier des comprimés, simples ou dragéifiés, des gélules, des granules, des
5 gouttes ou encore des préparations des liposomes éventuellement à libération retardée.

En ce qui concerne l'administration par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire, on a recours à des solutions stériles ou stérilisables en particulier pour perfusion veineuse, tandis que l'on peut réaliser les patches
10 conventionnels pour l'administration par voie transdermique.

Les compositions pharmaceutiques selon la présente invention peuvent être préparées selon des méthodes usuelles bien connues dans le domaine de la technique pharmaceutique.

Le principe actif peut être incorporé dans les excipients
15 habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les différents agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs, etc.

20 La quantité de principe actif à administrer par jour dépend bien entendu de la spécificité de l'indication thérapeutique, de la gravité des affections à traiter, ainsi que du poids du malade et de la voie d'administration.

A titre illustratif, les composés de formule générale I et II peuvent être administrés à raison de 10 à 100 mg/kg selon la voie d'administration
25 retenue.

Les exemples figurant ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

ABREVIATIONS

	Ac₆C :	1-amino cyclohexyl
	Aha	acide 6-aminohéxanoïque
	Asn :	asparagine
5	Boc :	tert-butyloxycarbonyl
	DCC :	N, N'-dicyclohexylcarbodiimide
	DIEA :	diisopropyléthylamine
	DMF :	N, N-diméthylformamide
	Fmoc :	9-fluorènylméthoxycarbonyl
10	Hepes :	N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonic acide)
	HOBt :	1-hydroxybenzotriazole
	HMDS :	hexaméthylidisiloxane
	mAZ :	(meta-amino)benzyloxycarbonyl
	MDPSE :	(méthyl diphenylsilyl)éthyl
15	NMP :	N-méthyl pyrrolidone
	ONp :	O-p-nitrophényl ester
	Phe :	phénylalanine
	Pmp :	phosphonométhylphénylalanine
	pTyr :	phosphotyrosine
20	TFA :	acide trifluoroacétique
	TFFH :	tetraméthylfluoroformamidinium hexafluorophosphate
	TIPS :	triisopropylsilane
	Trt :	trityl
	Tyr :	tyrosine

EXEMPLE 1 • mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-NH₂**1). Fmoc-L-(α -Me)Tyr-OH**

Le composé L-(α -Me)Tyr-OH (500 mg, 2,56 mmol) est dissous dans 2 équivalents de NaOH 0,5N (10,4 ml, 5,2 mmol), puis une solution du composé Fmoc-Cl (1,35 g, 5,2 mmol) dans l'acétonitrile (5,2 ml) est ajoutée et l'ensemble est maintenu sous agitation pendant 3 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant organique, on ajoute une solution aqueuse du Na₂CO₃ à 10% (25 ml) et la suspension est lavée par de l'éther éthylique (3 x 50ml). La suspension aqueuse est ensuite acidifiée à pH 1 par HCl 6N et extraite par le chloroforme (4 x 50 ml). La phase organique est ensuite lavée successivement par 2N HCl (1 x 50 ml), H₂O (1 x 50 ml), une solution saturée de NaCl (1 x 50ml) et puis séchée sur Na₂SO₄. Après filtration et évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 95/5/1). On obtient 1,09 g de Fmoc-L-(α -Me)Tyr-OH, sous forme de poudre blanche (rendement : 100%).

R_f=0.58 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 95/5/5)

RMN ¹H (DMSO-d₆) (δppm/HMDS) : 1,15 (s, 3H, α -Me), 2,75 et 3,05 (dd, 2H, CH₂β), 4,25 (m, 2H, 9'-CH₂ de Fmoc), 4,45 (m, 1H, 9'-H de Fmoc), 6,55 et 6,75 (dd, 4H, 2, 3, 5, 6-H de Tyr), 7,15 (s, 1H, NH), 7,30 (t, 2H, 2', 7'-H de Fmoc), 7,40 (t, 2H, 3', 6'-H de Fmoc), 7,70 (d, 2H, 4', 5'-H de Fmoc), 7,85 (d, 2H, 1', 8'-H de Fmoc), 9,12 (s, 1H, OH).

2). Fmoc-L-(α -Me)Tyr(PO₃Bzl₂)-OH

Le composé Fmoc-L-(α -Me)Tyr-OH (417 mg, 1 mmol) est dissous dans le THF anhydre (3 ml) à température ambiante et sous azote. On y ajoute la N-méthylmorpholine (0,11 ml, 1 mmol) et le chlorure de tert-butyl diméthylsilane (1M dans THF, 1,0 ml, 1 mmol). L'agitation est maintenue pendant 15 minutes. Ensuite, on y ajoute successivement le 1H-tetrazole (210 mg, 3 mmol) et le N, N-diisopropyl dibenzylphosphoramidite (1,0 ml, 3 mmol) et l'agitation est maintenue à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange est refroidi à 0°C, on ajoute l'acide méta-chloropéroxybenzoïque (56 à 85%, 690 mg) et la suspension devient claire. L'agitation est maintenue à 0°C

pendant 1 heure et ensuite à température ambiante pendant 30 minutes. La solution est de nouveau refroidie à 0°C et on ajoute NaHSO₃ 5% (25 ml). Le mélange est agité à 0°C pendant 30 minutes puis ramené à température ambiante en 30 minutes. Après évaporation du solvant organique, le résidu aqueux est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 20 ml). La phase organique est ensuite lavée successivement par NaHSO₃ 5% (3 x 25 ml), KHSO₄ 1M (2 x 25 ml), H₂O (1 x 25 ml), une solution saturée de NaCl (1 x 25 ml), puis séchée sur Na₂SO₄. Après filtration et évaporation du solvant, le résidu est repris dans le dichlorométhane (10 ml), le solide insoluble est filtré et la solution est évaporée à sec, puis purifiée par chromatographie sur colonne (éluant: CH₂Cl₂/MeOH 20/1). On obtient 572 mg de Fmoc-L-(α -Me)Tyr(PO₃Bzl₂)-OH, sous forme de poudre blanche (rendement : 84%).

R_f = 0,40 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1).

RMN ¹H (DMSO-d₆) (δ ppm/HMDS) : 1,25 (s, 3H, α -Me), 3,02 (m, 2H, CH₂B), 4,15 (m, 2H, 9'-CH₂ de Fmoc), 4,30 (m, 1H, 9'-H de Fmoc), 5,07 (d, 4H, CH₂ de Bzl), 6,85 et 6,95 (dd, 4H, 2, 3, 5, 6-H de Tyr), 7,3 (m, 15H, NH+10H aromatiques de Bzl et 2', 3', 6', 7'-H de Fmoc), 7,50 et 7,55 (dd, 2H, 4', 5'-H de Fmoc), 7,80 (m, 2H, 1', 8'-H de Fmoc).

3). 3-[N-(tert-Butyloxycarbonyl)amino]benzyl alcool

L'alcool 3-aminobenzyle (12,32 g, 0,1 mol) est dissous dans le THF (315 ml) et NaOH 1N (315 ml) et refroidi à 0°C. On ajoute ensuite Boc₂O (65,5 g, 0,3 mol). L'agitation est maintenue pendant la nuit et la température revient graduellement jusqu'à la température ambiante. Après évaporation du solvant organique, le résidu est acidifié à pH 2 par KHSO₄ 1M puis extrait par CH₂Cl₂ (4 x 200 ml). La phase organique est ensuite lavée successivement par KHSO₄ 1M (1 x 300 ml), H₂O (1 x 300 ml), une solution saturée de NaCl (1 x 500 ml) puis séchée sur Na₂SO₄. Après filtration et évaporation à sec, le résidu est récrystallisé avec de l'éther de pétrole (300 ml). Le précipité est filtré et séché. On obtient 21,2g de produit, sous forme de poudre blanche (rendement 95 %).

R_f = 0,42 (CH₂Cl₂/MeOH 95/5)

RMN ^1H (DMSO- d_6) (δ ppm/HMDS) : 1,42 (s, 9H, tBu), 4,40 (d, 2H, CH_2O), 5,10 (t, 1H, OH), 6,85 (d, 1H, 6-H), 7,12 (t, 1H, 5-H), 7,25 (d, 1H, 4-H), 7,45 (s, 1H, 2-H), 9,23 (s, 1H, NH).

4). **3-[N-(tert-Butyloxycarbonyl)amino]benzyl-4-nitrophenyl carbonate (Boc-mAZ-ONp)**

Le composé 3-[N-(tert-Butyloxycarbonyl)amino]benzyl alcool (1,0 g, 4,5 mmol) est dissous dans la pyridine (18 ml) et la solution est refroidie à 0°C. On ajoute alors le 4-nitrophenyl chloroformiate (0,91 g, 4,5 mmol) et l'agitation est maintenue pendant la nuit tandis que la solution revient à la température ambiante. Après évaporation du solvant sous vide, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne (éluant: dichlorométhane). On obtient 644mg de produit sous forme de poudre blanche (rendement: 37%).

$R_f = 0,35$ (CH_2Cl_2)

RMN ^1H (DMSO- d_6) (δ ppm/HMDS) : 1,40 (s, 9H, tBu), 5,23 (s, 2H, CH_2O), 7,00 (d, 1H, 6-H), 7,25 (t, 1H, 5-H), 7,36 (d, 1H, 4-H), 7,59 (s, 1H, 2-H), 7,53 (d, 2H, 2', 6'-H), 8,25 (d, 2H, 3', 5'-H), 9,40 (s, 1H, NH).

5). **mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-NH $_2$**

La synthèse du peptide est réalisée sur un synthétiseur 431A Applied Biosystem, programmé pour la chimie Fmoc.

Après la déprotection du groupement Fmoc de la résine amide Rink MBHA (200 mg, 0,1 mmol, Novabiochem) par 20 % de piperidine dans le NMP, le premier acide aminé sous forme de Fmoc-Asn(Trt)-OH est couplé avec le mélange DCC/HOBt dans le solvant NMP pendant 1 heure. Le groupement Fmoc est de nouveau déprotégé par 20 % de piperidine dans le NMP. A cause de l'encombrement du groupement α -méthyle, le deuxième acide aminé sous forme de Fmoc-(α -Me)Tyr(PO_3Bzl_2)-OH (0,5 mmol), est couplé par un agent de couplage plus efficace le TFFH (0,5 mmol) en présence de DIEA (1,0 mmol) dans le solvant DMF (4 ml). On met une cartouche contenant tous ces composés et on les transfère dans le réacteur contenant la résine peptidique. Le couplage est maintenu pendant 4 heures.

Ensuite, le groupement Fmoc est déprotégé et le troisième acide aminé sous forme de Fmoc-Tyr(PO₃MDPSE₂)-OH (0,5 mmol) est couplé de la même façon par le TFFH (0,5 mmol)/DIEA (1,0 mmol) dans le DMF (4 ml) pendant 4 heures. Après déprotection du groupement Fmoc par 20% de piperidine dans le NMP, le composé Boc-mAZ-ONp (1 mmol) est couplé dans le NMP en présence de DIEA (1,2 mmol) pendant 6 heures, puis on lave la résine peptidique par le NMP et le dichlorométhane. On sèche la résine peptidique sous vide et elle est ensuite mise en suspension dans un mélange de TFA/TIPS/H₂O (19 ml/0,5 ml/0,5 ml) en agitant pendant 30 minutes à 0°C, puis 3 heures à température ambiante.

La résine est ensuite filtrée et lavée au TFA. La solution est évaporée et le résidu est précipité par de l'éther éthylique froid. La suspension est centrifugée, le surnageant est décanté. Le précipité est alors remis en suspension dans de l'éther refroidi et à nouveau centrifugé. Le précipité est ensuite dissout dans H₂O (50 ml) et lyophilisé. Le peptide brut obtenu est ensuite purifié sur colonne C18 (Vydac, 5 µ, 10 x 250 mm) en HPLC semi-préparative (Waters 600 controler) avec un détecteur UV à 220 nm (Waters 480) et les phases mobiles A (H₂O + 0,1 % TFA) et B (70 % CH₃CN + 0,09 % TFA), un débit de 2 ml/min, et un gradient à 100 % A en 20 minutes, puis augmenté à 15% B pendant 100 minutes. Les fractions purifiées sont ensuite analysées par HPLC (Shimadzu LC-91) sur colonne analytique C18 (Vydac, 5 µ, 4,6 x 150 mm) avec un détecteur UV à 220 nm (Shimadzu SPD-10A), avec un débit de 1ml/min. Le temps de rétention du peptide est de 8,5 min pour un gradient de 5 % à 65 % B en 30 minutes. On obtient 17 mg du peptide après lyophilisation des fractions contenant le peptide pur. La structure du peptide est confirmée par spectrométrie de masse par electrospray (MS 803,3 pour 803,6, M-H⁺+Na⁺) et par spectrométrie de RMN.

RMN ¹H (DMSO-d₆+TFA) (δppm/HMDS) : 1,23 (s, 3H, α-Me), 2,45-2,55 (m, 2H, CH₂β de Asn), 2,70 et 3,00 (mm, 2H, CH₂β de pTyr), 3,05 (m, 2H, CH₂β de (α-Me)pTyr), 4,02 (m, 1H, CHα de Asn), 4,25 (m, 1H, CHα de pTyr), 4,95 (q, 2H, CH₂O de mAZ), 6,9-7,4 (m, 1H, H-Ar), 7,68 (d, 1H, NH de Asn), 7,85 (d, 1H, de pTyr), NH 8,30 (s, 1H, NH de (α-Me)pTyr).

EXEMPLE 2 • mAZ-pTyr-(α -Me)Tyr-Asn-NH₂ (composé témoin)

Ce peptide est synthétisé de la même façon que le peptide mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-NH₂ avec le composé Fmoc-(α -Me)Tyr-OH remplaçant Fmoc-(α -Me)Tyr(PO₃Bzl₂)-OH.

5 MS : 723,0 pour 700,61, M-H⁺+Na⁺

RMN : ¹H (DMSO-d₆+TFA) (δ ppm/HMDS) : 1,22 (s, 3H, α -Me), 2,45-2,55 (m, 2H, CH₂ β de Asn), 2,70 et 3,05 (m, 4H, CH₂ β de pTyr et de (α -Me)pTyr), 4,00 (m, 1H, CH α de Asn), 4,22 (m, 1H, CH α de pTyr), 4,95 (q, 2H, CH₂O de mAZ), 6,6-7,4 (m, 1H, H-Ar), 7,65 (d, 1H, NH de Asn), 7,85 (d, 1H, NH de pTyr), 8,20 (s, 1H, NH de (α -Me)pTyr).

EXEMPLE 3 • mAZ-pTyr-pTyr-Asn-NH₂ (composé témoin)

Ce peptide est synthétisé de la même façon que le peptide mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-NH₂, mais les trois acides aminés sont couplés par le mélange DCC/HOBt.

15 MS : 789,1 pour 766,56, M-H⁺+Na⁺

RMN : ¹H (DMSO-d₆+TFA) (δ ppm/HMDS) : 2,35-3,0 (m, 6H, CH₂ β de Asn et de deux pTyr), 4,15 (m, 1H, CH α de Asn), 4,40 (m, 2H, CH α de deux pTyr), 4,95 (q, 2H, CH₂O de mAZ), 7,0-7,4 (m, 14H, NH₂ et H-Ar), 7,45 (d, 1H, NH de Asn), 8,20 (t, 2H, NH de deux pTyr).

20 EXEMPLE 4 • mAZ-pTyr- (4-CO₂H)(α -Me)Phe-Asn-NH₂**1). 4-Méthylbenzoate de *tert*-butyle**

On ajoute goutte à goutte une solution de chlorure de 4-méthylbenzoyle (10,00 g, 64,7 mmol), dans de l'éther éthylique anhydre (50 ml), à une suspension de *tert*-butoxyde de lithium (5,50 g, 68,7 mmol), dans le *tert*-butanol (100 ml) à la température ambiante. Après une heure d'agitation, on évapore les solvants et on dissout le résidu dans de l'acétate d'éthyle (200 ml). La solution est alors lavée successivement par H₂O (1 x 50 ml), NaOH 1N (2 x 50 ml), H₂O (1 x 50 ml), une solution saturée de NaCl (1 x 50 ml), puis séchée sur Na₂SO₄. Après filtration et évaporation du solvant, on obtient 12,5 g de produit, sous forme d'huile transparente (Rendement 100 %).

30 R_f = 0,64 (AcOEt/c-hexane 1/10).

RMN ^1H (DMSO- d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,50 (s, 9H, *t*Bu), 2,35 (s, 3H, Me), 7,25 et 7,75 (dd, 4H, Ar-H).

2). (4-Bromométhyl)benzoate de *tert*-butyle

Un mélange de 4-méthylbenzoate de *tert*-butyle (12,00 g, 62,4 mmol), N-bromosuccinimide (12,00 g, 67,4 mmol) et peroxyde de dibenzoyl
5 (0,82 g, 3,4 mmol) dans CCl_4 est chauffé à reflux pendant 3 heures. Le solide est filtré et le solvant évaporé. Le résidu est ensuite repris dans l'acétate d'éthyle (200 ml) et lavé par H_2O (2 x 50 ml) et une solution saturée de NaCl (1 x 50 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , le solvant est évaporé
10 et l'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de silice (éluant: AcOEt/c-Hexane 1/15). On obtient 13,0g de produit 2, sous forme d'huile transparente (Rendement 77 %).

$R_f = 0,42$ (AcOEt/c-Hexane 1/15).

RMN ^1H (DMSO- d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,47 (s, 9H, *t*Bu), 4,65 (s, 2H, CH_2Br), 7,50 et 7,85 (dd, 4H, Ar-H).
15

3). (3S, 5S, 6R)-4-(Benzyloxycarbonyl)-5, 6-diphenyl-3-méthyl-2, 3, 5, 6-tetrahydro-4H-1, 4-oxazin-2-one

Le (2R, 3S)-(-)-6-oxo-2, 3-diphenyl-4-morpholinecarboxylate de benzyle (3,00 g, 7,74 mmol) est dissous dans le THF anhydre (200 ml) à -78°C
20 sous azote. On y ajoute de l'iodure de méthyle (4,8 ml, 77,4 mmol), puis goutte à goutte une solution 1M de NaHMDS dans le THF (9,3 ml, 9,3 mmol). L'agitation est maintenue pendant une demi-heure à -78°C . Ensuite on ajoute l'acétate d'éthyle (300 ml) et la phase organique est successivement lavée par H_2O (2 x 150ml), une solution saturée de NaCl (1 x 200 ml), puis séchée sur
25 Na_2SO_4 . Après filtration et évaporation, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant: AcOEt/c-hexane 1/3). On obtient 2,10 g de produit 3, sous forme de poudre blanche (Rendement 68 %).

$R_f = 0,60$ (AcOEt/c-hexane 1/2).

RMN ^1H (DMSO- d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$): 1,70 (d, 3H, 3-Me), 4,8-5,3 (m, 4H, 3-H, 5-H et CH_2 de Cbz), 6,25 (d, 1H, 6-H), 6,50 (t, 2H, Ar-H), 6,70 (d, 1H, Ar-H), 7,0-7,4 (m, 12H, Ar-H).
30

4). (3S, 5S, 6R)-4-(Benzyloxycarbonyl)-5, 6-diphényl-3-méthyl-3-[(4'-*tert*-butoxycarbonyl)benzyl]-2, 3, 5, 6-tetrahydro-4*H*-1, 4-oxazin-2-one.

Le composé 3 (1,00 g, 2,5 mmol) est dissous dans le THF anhydre (20 ml), à la température de -78°C sous azote. On y ajoute, goutte à goutte, une solution 0,5M de KHMDs dans le toluène (15 ml, 97,5 mmol). Après moins de 5 minutes, on ajoute goutte à goutte une solution du composé 2 (4,0 g, 14,7 mmol), dans du THF anhydre (10 ml). L'agitation est maintenue pendant une demi-heure à -78°C. Puis on le traite selon la même méthode que celle décrite pour synthétiser le composé 3. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant: AcOEt/c-Hexane 1/10). On obtient 650 mg de produit 4, sous forme de poudre blanche (Rendement 44%).

R_f = 0,32 (AcOEt/c-Hexane 1/10).

RMN ¹H (DMSO-d₆) (δppm/HMDS): 1,50 (s, 9H, tBu), 1,80 (s, 3H, 3-Me), 3,25 et 3,95 (dm, 2H, CH₂), 4,55 (s, 1H, 5-H), 5,55 (s, 2H, CH₂ de Cbz), 5,70 (d, 1H, 6-H), 6,70 (m, 4H, Ar-H), 7,0-7,3 (m, 13H, NH et Ar-H), 7,80 (d, 2H, Ar-H).

5). (S)-α-Méthyl-4-(*tert*-butoxycarbonyl)phénylalanine

Le composé 4 (60 mg, 0,101 mmol) est dissous dans un mélange de THF/EtOH (1/1, 4 ml), on y ajoute du palladium sur charbon à 10% (6 mg) et la suspension est hydrogénée à pression ordinaire pendant une nuit. On filtre le catalyseur sur célite et on évapore le solvant. Le résidu est précité à l'éther et centrifugé. On obtient 28 mg de produit 5, sous forme de poudre blanche (rendement 99%).

RMN ¹H (DMSO-d₆+TFA) (δppm/HMDS) : 1,40 (s, 3H, α-Me), 1,48 (s, 9H, tBu), 3,05 (q, 2H, CH₂), 7,25 et 7,80 (dd, 4H, Ar-H), 8,25 (s, 3H, NH₃⁺).

6). (S)-N-Fluorénylméthoxycarbonyl-α-méthyl-4-(*tert*-butoxycarbonyl) phénylalanine

Le composé 5 (188 mg, 0,673 mmol) est dissous dans un mélange de dioxane/NaHCO₃ 10 % (1/1, 30 ml), puis on y ajoute le Fmoc-Cl (500 mg, 1,93 mmol). Le mélange est agité pendant 3 heures à la température

ambiante, puis il est acidifié par une solution à 10% d'acide citrique jusqu'à pH 2. On extrait par CH_2Cl_2 (4 x 25ml) et la phase organique est lavée par H_2O (1 x 30 ml), une solution saturée de NaCl (1 x 30 ml) et séchée sur Na_2SO_4 . Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5). On obtient 280 mg de produit **6**, sous forme de poudre blanche (rendement 83 %).

$R_f = 0,18$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5).

RMN ^1H (DMSO-d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,15 (s, 3H, $\alpha\text{-Me}$), 1,50 (s, 9H, tBu), 2,95 et 3,25 (dd, 2H, CH_2), 4,20 (t, 1H, 9'-H de Fmoc), 4,25 et 4,40 (mm, 2H, 9'- CH_2 de Fmoc), 7,05 (3H, NH et 2, 6-Ar-H de Phe), 7,28 (t, 2H, 2', 7'-H de Fmoc), 7,35 (t, 2H, 3', 6'-H de fmoc), 7,65 (m, 4H, 3, 5-Ar-H de Phe et 4', 5'-H de Fmoc), 7,85 (d, 2H, 1', 8'-H de Fmoc).

Le peptide est synthétisé selon la même méthode que celle décrite pour le peptide en exemple 1 (mAZ-pTyr-($\alpha\text{-Me}$)pTyr-Asn- NH_2).

MS : 751,1 pour 728,62, $\text{M-H}^+ + \text{Na}^+$

RMN : ^1H ($\text{DMSO-d}_6 + \text{TFA}$) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,18 (s, 3H, $\alpha\text{-Me}$), 2,30-3,22 (m, 6H, CH_2 de Asn, pTyr et ($\alpha\text{-Me}$)pTyr), 4,20 (m, 2H, CH_α de Asn et pTyr), 4,85 (q, 2H, CH_2O de mAZ), 7,0-7,5 (m, 1H, H-Ar), 7,65 (d, 1H, NH de Asn), 7,85 (d, 1H, NH de pTyr), 8,20 (s, 1H, NH de ($\alpha\text{-Me}$)Phe).

EXEMPLE 5 • mAZ-pTyr-(4- $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$)(αMe)Phe-Asn- NH_2

1). (4-Bromométhyl)phényl acétate de *tert*-butyle

Un mélange d'acide 4-bromométhyl phénylacétique (9,7 g, 42,34 mmol) et de chlorure de thionyle (100 ml) est chauffé à reflux pendant 3 heures. On évapore ensuite l'excès de chlorure de thionyle et on sèche le résidu solide à la pompe à vide. Puis on dissout le produit dans le minimum de CH_2Cl_2 (4 ml) et ajoute cette solution goutte à goutte à une solution de *tert*-butanol (140 ml) et CH_2Cl_2 (5 ml) refroidie à 0°C . L'agitation est maintenue à 4°C pendant la nuit. On ajoute ensuite CH_2Cl_2 (100 ml) et on lave la phase organique successivement par H_2O (1 x 50 ml), NaHCO_3 10% (1 x 50 ml), H_2O (1 x 50 ml) et une solution saturée de NaCl (1 x 50 ml). On sèche la phase

organique sur Na_2SO_4 , et après évaporation du solvant et séchage à la pompe à vide, on obtient 10,9 g de produit solide (rendement 91%).

$R_f = 0,70$ (CH_2Cl_2).

RMN ^1H (DMSO- d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,35 (s, 9H, *t*Bu), 3,50 (s, 2H, CH_2CO_2), 4,65 (s, 2H, CH_2Br), 7,20 et 7,35 (dd, 4H, Ar-H).

2). (3S, 5S, 6R)-4-(Benzyloxycarbonyl)-5, 6-diphenyl-3-méthyl-3-[[[(4'-*tert*-butoxycarbonyl)méthyl] benzyl]-2,3,5,6-tetrahydro-4H-1, 4-oxazin-2-one.

Le composé **2** est préparé selon la même méthode que celle décrite pour le composé **4** de l'exemple 4 (Rendement 31%).

$R_f = 0,25$ (EtOAc/c-Hexane 1/10).

RMN ^1H (DMSO- d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,30 (s, 9H, *t*Bu), 1,85 (s, 3H, 3-Me), 3,1 et 4,0 (dm, 2H, $\text{CH}_2\beta$), 3,55 (s, 2H, CH_2CO_2), 4,25 (s, 1H, 5-H), 5,1 (m, 3H, CH_2 de Cbz et 6-H), 6,65-7,30 (m, 20H, NH et Ar-H).

3). (S)- α -Méthyl-4-[(*tert*-butoxycarbonyl)méthyl]phénylalanine

Le composé **3** est préparé selon la même méthode que celle décrite pour le composé **5** de l'exemple 4. (Rendement 90%).

RMN ^1H (DMSO- d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,30 (s, 3H, α -Me), 1,35 (s, 9H, *t*Bu), 3,0 (q, 2H, $\text{CH}_2\beta$), 3,50 (s, 2H, CH_2CO_2), 7,15 (m, 6H, NH₂ et H-Ar).

4). (S)-N-Fluorénylméthoxycarbonyl- α -méthyl-4-[(*tert*-butoxycarbonyl) méthyl] phénylalanine

Le composé **4** est préparé selon la même méthode que celle décrite pour le composé **6** de l'exemple 4. (Rendement 50%).

$R_f = 0,12$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5).

RMN ^1H (DMSO- d_6) ($\delta\text{ppm/HMDS}$) : 1,20 (s, 3H, α -Me), 1,35 (s, 9H, *t*Bu), 3,0 (q, 2H, $\text{CH}_2\beta$), 3,40 (s, 2H CH_2CO_2), 4,15 (t, 1H, 9'-H de Fmoc), 4,28 (m, 2H, 9'- CH_2 de Fmoc), 6,95 (q, 4H, Ar-H de Phe), 7,26 (t, 2H, 2', 7'-H de Fmoc), 7,35 (t, 2H, 3', 6'-H de fmoc), 7,6 (m, 3H, NH et 4', 5'-H de Fmoc), 7,85 (d, 2H, 1', 8'-H de Fmoc).

5). mAZ-pTyr-(4-CH₂CO₂H)(α -Me)Phe-Asn-NH₂

Le peptide 5 est synthétisé selon la même méthode que celle décrite pour le peptide de l'exemple 1 (mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-NH₂).

MS : 765,0 pour 742,65, M-H⁺+Na⁺

5 RMN : ¹H (DMSO-d₆+TFA) (δ ppm/HMDS) : 1,22 (s, 3H, α -Me), 2,35-3,05 (m, 6H, CH₂ β de Asn, pTyr et (α -Me)pTyr), 3,42 (s, 2H, CH₂CO₂H), 4,20 (m, 2H, CH α de Asn et pTyr), 4,85 (q, 2H, CH₂O de mAZ), 7,0-7,4 (m, 12H, H-Ar), 7,65 (d, 1H, NH de Asn), 7,75 (d, 1H, NH de pTyr), 8,35 (s, 1H, NH de (α -Me)Phe).

10

EXEMPLE 6 • mAZ-Pmp-(α -Me) pTyr-Asn-NH₂

Le peptide est synthétisé selon la même méthode que celle décrite pour le peptide de l'exemple 1 (mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-NH₂) en utilisant Fmoc-Pmp(tBu₂)-OH (Liu, W.-Q. Tetrahedron : Asymmetry, 1995, 6 :
15 647-650) à la place de Fmoc-pTyr(PO₃MDPSE₂)-OH.

MS 800,2 pour 778,64, M-H⁺+Na⁺

EXEMPLE 7 • mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-Aha-IRQPKIWIPNRRKPWKK

20 La synthèse de ce peptide est réalisée sur un synthétiseur 431A Applied Biosystem, programmé pour la chimie Fmoc.

Le premier acide aminé sous forme de Fmoc-Lys(Boc)-OH est couplé sur la résine HMP (100 mg, 0,089mmol, Applied Biosystem) avec le mélange DCC/DMAP. Les 18 acides aminés suivants sont ensuite couplés par
25 la répétition de déprotection/couplage. Les résidus (α -Me)pTyr, pTyr et mAZ sont introduits selon la méthode décrite pour la synthèse de l'exemple 1 (mAZ-pTyr-(α -Me)pTyr-Asn-NH₂). La résine peptidique est clivée par un mélange de TFA/TIPS/PhOH/H₂O (20 ml/1 ml/1,5 g/1 ml). Le peptide brut précipité par l'éther est purifié par HPLC sur une colonne C18 (Vydac, 5 μ , 10 x 250 mm),
30 les phases mobiles A (H₂O + 0,1 % TFA) et B (70 % CH₃CN + 0,09 % TFA), un débit de 2 ml/min, et un gradient à 5 % B en 20 minutes, puis augmenté à 35 % B pendant 100 minutes. Les fractions purifiées sont ensuite analysées par

HPLC sur colonne analytique C18 (Vydac, 5 μ , 4,6 x 150 mm), un débit de 1ml/min. Le temps de rétention du peptide est de 14,7 min pour un gradient de 25 % à 35 % B en 30 minutes. La structure du peptide est confirmée par spectrométrie de masse par electrospray (MS 3041,1 pour 3042,3).

5 **EXEMPLE 8**

Affinités des peptidomimétiques pour Grb2

Les affinités des composés pour Grb2, sont mesurées à 25°C dans un tampon HEPES 50mM et DTT 1mM, pH 7,5, par fluorescence en mesurant le spectre d'émission à 345 nm (fente 5,0 nm) sous excitation à
10 292 nm (fente 5,0 nm), selon le protocole décrit par Cussac et al. (EMBO J., 1994, 13, 4011-4021) et sont rapportées dans le tableau 1. Elles y sont exprimées en constante de dissociation Kd.

Chacun des composés a par ailleurs été testé selon un test ELISA, pour sa capacité à entrer en compétition avec l'interaction entre Grb2 et
15 un peptide phosphotyrosine issu de la protéine Shc et correspondant à la tyrosine 317 (PSpYVNVQN) dont l'affinité pour Grb2 a été évaluée par fluorescence (Kd = 18 nM).

Ce test ELISA a été mis au point afin d'éviter de déclarer inactif un composé n'induisant pas de variation de fluorescence lors de l'interaction.

20 Des plaques pré-traitées à la streptavidine (Boehringer) sont incubées avec 100 μ l d'une solution de peptide biotine-Aha-PSpYVNVQN (Aha : acide 6-amino-hexanoïque) (solution 100 nM dans du tampon TBS : Tris 100 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5) par puits, une nuit à 4°C. La liaison non spécifique est ensuite bloquée en incubant 4 heures avec le même tampon
25 contenant 3 % de lait écrémé (800 μ l par puits). Les produits à tester sont répartis dans les puits, à la dilution voulue dans le tampon précédant contenant 3 % de lait écrémé et 40 ng/ml de GST-Grb2 (100 μ l par puits). Après une nuit d'incubation, les plaques sont soigneusement rincées 4 fois à l'aide de TBS-lait-0,05 % tween 20 puis incubées 2 heures à 37°C, en présence de 100 μ l par
30 puits d'anticorps anti-GST (Transduction, dilution 1/500 dans TBS-lait-0,05 % tween 20). Les plaques sont ensuite soigneusement rincées 4 fois à l'aide de

TBS-lait-0,05 % tween 20 puis incubées 45 minutes à 37°C en présence de 100 µl par puits d'anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (Amersham, dilution 1/1000 dans TBS-lait-0,05 % tween 20). Les plaques sont soigneusement rincées à l'aide de TBS-lait-0,05 % tween 20 puis incubées en
5 présence de 200 µl par puits de solution de révélation TMB (Interchim), jusqu'à développement suffisant d'une coloration bleue. La réaction est alors stoppée par ajout de 100 µl par puits d'acide sulfurique 10 % (V/V). La lecture est effectuée à 550 nm. La valeur lue pour chaque puits est ensuite diminuée de la
10 valeur témoin d'un puits équivalent sans peptide biotine-Aha-PSpYVNVQN fixé puis traité comme son homologue avec peptide fixé. Les valeurs sont alors traitées grâce au le logiciel "Origin 40" afin d'obtenir des concentrations inhibitrices 50 %.

Tableau 1
Affinités mesurées par fluorescence et Cl_{50} en ELISA (déplacement Grb2/biotine-Aha-PSpYVNVQN).

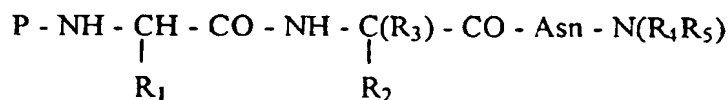
	Produit	fluo (nM) K_d :	Cl_{50} ELISA (nM)
Témoin	PSpYVNVQN (Shc 317)	18	71 (+/-5)
Témoin	mAZ-pTyr-Acac-Asn-NH ₂ ^a	30	120 (+/-8)
Témoin	mAZ-pTyr-pTyr-Asn-NH ₂	60	235 (+/-42)
Témoin	mAZ-pTyr-(α Me)Tyr-Asn-NH ₂	250	1098 (+/-160)
Produit de formule I	mAZ-pTyr-(α Me)pTyr-Asn-NH ₂	3	11 (+/-1)
Produit de formule I	mAZ-pTyr-(α Me)pTyr-Asn-NH ₂ -Antennapedia	non mesurable	13 (+/-2)
Produit de formule I	mAZ-Pmp [*] -(α Me)pTyr-Asn-NH ₂		42 (+/-22)
Produit de formule I	mAZ-pTyr-(α Me)Phe(COOH)-Asn-NH ₂	45	153 (+/-38)
Produit de formule I	mAZ-pTyr-(α Me)Phe(CH ₂ -COOH)-Asn-NH ₂	60	198 (+/-41)

* Pmp : phosphonométhylphénylalanine

a : Composé Novartis

REVENDICATIONS

1. Composé répondant à la formule générale I



- 5 dans laquelle :

- P représente un groupement protecteur, ou un atome d'hydrogène
- R₁ représente
 - un radical phénylméthyle avec le noyau phényle étant
 - 10 substitué en position para par un radical phosphate, phosphonométhyle, phosphonomonofluorométhyle ou phosphonodifluorométhyle ou
 - un radical naphthylméthyle pouvant être substitué en position 4 par un radical phosphate, phosphonométhyle, phosphonomono- ou phosphonodi- difluorométhyle,
 - 15 chacun de ces radicaux étant en outre le cas échéant substitués par un ou plusieurs substituants choisis parmi les groupements alcoyle en C₁ à C₄, alcoxy en C₁ à C₄, et/ou un ou plusieurs atomes d'halogène,
- R₂ représente :
 - un radical phénylméthyle ou naphthylméthyle ou
 - 20 cyclohexylméthyle, 2- ou 3-pyridinylméthyle, substitué sur le cycle en position para par un groupement phosphate, phosphonoalkyle en C₁ à C₂, phosphonomonofluorométhyle, phosphonodifluorométhyle, phosphonate, phosphinate, sulfonate, sulfonométhyle, carboxylate, carboxyméthyle, carboxyméthoxy, malonyl, 2-(dicarboxy)éthyle, 2-malonyloxy, 5-tétrazolyloxy
 - 25 ou 5-tétrazolylméthyle ou
 - un radical alkyle de type (CH₂)_n (avec n = 3 ou 4) substitué en position terminale par un groupement phosphate, phosphonoalkyle en C₁ à C₂ et de préférence phosphonomonofluorométhyle et phosphonodifluorométhyle, phosphonate, phosphinate, sulfonate,

sulfonométhyle, carboxylate, carboxyméthyle, carboxyméthoxy, malonyl, 2-malonyloxy, 2-dicarboxyéthyle, 5-tétrazolyle ou 5-tétrazolylméthyle.

- R_3 représente un groupement alkyle en C_1 à C_4 , linéaire ou ramifié ou alkylcycloalkyle avec un cycloalkyle en C_3 à C_6 .
- 5 — R_4 et/ou R_5 représentent
 - un atome d'hydrogène,
 - un groupement alkyle en C_1 à C_6 , linéaire ou ramifié
 - un groupement arylalkyle en C_1 à C_6 avec aryl désignant un noyau phényle ou naphtyle le cas échéant substitué par un ou plusieurs
- 10 groupements hydroxyle, ou
 - un enchaînement de type aminohexanoïque suivi par les séquences RQIKIWFQNRRMKWKK, IRQPKIWFNRRKPWKK Cys-S-S-RQIKIWFQNRRMKWKK et Cys-S-S-Cys-IRQPKIWFNRRKPWKK, dérivés d'antennapedia et
- 15 leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale I dans laquelle :

- P représente un groupement RCO ou ROCO avec R
- 20 représentant un aminoalcoyle en C_{1-4} ou aminophénylcoyle en C_{1-4} ,
- R_1 représente un groupement phénylméthyle substitué en position para par un substituant choisi parmi OPO_3H_2 , $CH_2PO_3H_2$, $CHFPO_3H_2$ et $CF_2PO_3H_2$,
- R_2 représente un groupement phénylméthyle substitué en
- 25 position para par un substituant tel que défini en formule générale I,
- R_3 représente un groupement alcoyle en C_1 à C_3 ,
- R_4 et/ou R_5 représentent un atome d'hydrogène, un groupement alcoyle $(CH_2)_n-CH_3$ ou $(CH_2)_n-Ar$ avec Ar représentant un phényle ou α,β naphtyle substitué ou non et n compris entre 0 et 5 et leurs sels
- 30 pharmaceutiquement acceptables.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale I dans laquelle :

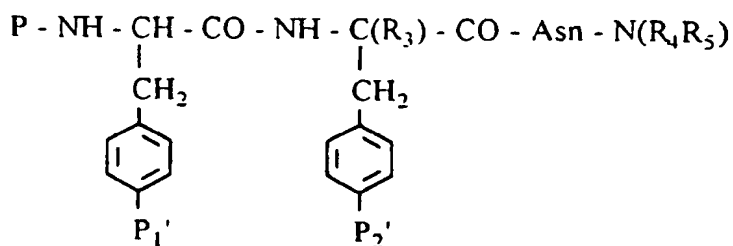
- R_1 représente un groupement phénylméthyle portant en position para un groupement phosphate,
- 5 - R_2 représente un groupement phénylméthyle portant en position para un groupement choisi parmi un phosphate, phosphonométhyle, 2-malonyloxy, un groupement $(CH_2)_nCO_2H$ avec n égal à 0 ou 1,
- R_3 représente un groupement méthyle et
- R_4 et R_5 représentent tous deux un atome d'hydrogène et
- 10 leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

4. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- mAZ-pTyr-(α Me)pTyr-Asn-NH₂
- 15 - mAZ-pTyr-(α Me)pTyr-Asn-NH-Aha-Antennapedia
- mAZ-Pmp-(α Me)pTyr-Asn-NH₂
- mAZ-pTyr-(α Me)Phe(COOH)-Asn-NH₂
- 20 - mAZ-pTyr-(α Me)Phe(CH₂-COOH)-Asn-NH₂.

5. Composé pseudopeptidique utile comme prodrogue d'un composé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale II

25



II

Dans laquelle P, R₃, R₄ et R₅ sont tels que définis en revendications 1 à 4 et les groupements phénylméthyles substitués par P₁' et P₂' sont les précurseurs des groupements R₁ et R₂ tels que définis en revendication 1.

5 6. Composé selon la revendication 5 caractérisé en ce que les groupements P₁' et/ou P₂', précurseurs des groupes phosphates R₁ et/ou R₂ sont un groupement bis-(S-acyl-2-thioéthyl)phosphate ou bis-(acyloxyméthyle) phosphate.

10 7. Composé selon la revendication 5 caractérisé en ce que les groupements P₁' et/ou P₂', précurseurs du groupe phosphonométhyle en R₁ et/ou R₂ sont un groupement bis-(S-acyl-2-thioéthyl)phosphonométhyle ou bis-(acyloxyméthyl) phosphonométhyle.

15 8. Composé selon la revendication 5 caractérisé en ce que le groupement P₂', précurseur du groupe phosphonate R₂ est un groupe bis-(S-acyl-2-thioéthyl)phosphonate ou bis-(acyloxyméthyl)phosphonate.

20 9. Composé selon la revendication 5 caractérisé en ce que le groupement P₂', précurseur des groupes acide carboxylique, carboxyméthyle, carboxyméthoxy, malonyl, 2-malonyloxy, 2-(dicarboxy)éthyle en R₂ est un analogue estérifié sur la ou les fonctions acides carboxyliques des groupes R₂ sous forme d'un carboxylate de :

25 — arylalcoyle où le terme aryl signifie un noyau benzénique et le terme alcoyle une chaîne carbonée linéaire ou ramifiée avec de 1 à 3 atomes de carbone ;

 — morpholinylalcoyle -(CH₂)_n (NC₄H₈O) ;

30 — pipéridinylalcoyle -(CH₂)_n (NC₅H₁₀) substitué éventuellement par un groupement OH, CO₂H, CO₂R' où R' est une chaîne alcoyle linéaire ou ramifiée contenant ou non un reste benzyle ou phényle ;

— pipérazinylalcoyle $-(CH_2)_n(NC_4H_8NH)$ substitué éventuellement par $(-N-C_4H_8-NR'')$ où R'' représente une chaîne alcoyle contenant de 1 à 6 atomes de carbone, un groupement benzyle ou un groupement phényl, avec n compris entre 1 et 3.

5 10. Composition pharmaceutique comprenant en tant que principe actif au moins un composé de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 4 ou un composé de formule générale II selon l'une des revendications 5 à 9.

10 11. Utilisation d'un composé de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 4 ou un composé de formule générale II selon l'une des revendications 5 à 9 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies liées à des processus prolifératifs, des cancers et/ou métastases.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSERM
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75013
- (G) TELEPHONE: 0144236000
- (H) TELECOPIE: 0145856856

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Composés pseudopeptidiques dotés d'une activité inhibitrice à l'égard des voies activées par les protéines à activité tyrosine kinase et les compositions pharmaceutiques les contenant.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Ile Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys
 1 5 10 15

Lys

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: pont disulfure
- (B) EMPLACEMENT: 1..2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Cys Cys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp
 1 5 10 15

Lys Lys

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: pont disulfure
- (B) EMPLACEMENT: 1..2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Cys Cys Ile Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro
 1 5 10 15

Trp Lys Lys

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2787793

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 571399
FR 9816459

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	GARCIA-ECHEVERRIA, CARLOS ET AL: "Potent Antagonists of the SH2 Domain of Grb2: Optimization of the X+1 Position of 3-Amino-Z-Tyr(PO3H2)-X+1-Asn-NH2" J. MED. CHEM. (1998), 41(11), 1741-1744 , 1998, XP002116591 * page 1741, colonne de droite, alinéa 2 - page 1742, colonne de droite, alinéa 1; tableau 1 *	1,10,11
A	WO 97 30079 A (PHARMACIA & UPJOHN SPA ;BATTISTINI CARLO (IT); GIORDANO PATRIZIA () 21 août 1997 (1997-08-21) * revendications; exemples *	1,10,11
A	WO 96 32411 A (KAVANAUGH WILLIAM MICHAEL ;WILLIAMS LEWIS T (US)) 17 octobre 1996 (1996-10-17) * revendications; exemples *	1,10,11
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 septembre 1999		Fuhr, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.92 (POMC19)

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM
 (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
 (C) VILLE: Paris
 (E) PAYS: France
 (F) CODE POSTAL: 75013
 (G) TELEPHONE: 0144236000
 (H) TELECOPIE: 0145856856

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Composés pseudopeptidiques dotés d'une activité inhibitrice à l'égard des voies activées par les protéines à activité tyrosine kinase et les compositions pharmaceutiques les contenant.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: non pertinent

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: non pertinent

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Ile Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys
 1 5 10 15

Lys

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: pont disulfure
- (B) EMPLACEMENT: 1..2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Cys Cys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp
 1 5 10 15

Lys Lys

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: pont disulfure
- (B) EMPLACEMENT: 1..2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Cys Cys Ile Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro
 1 5 10 15

Trp Lys Lys